

549,262

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
23. September 2004 (23.09.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2004/081166 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2004/000248

(22) Internationales Anmeldedatum: 12. Februar 2004 (12.02.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität: 103 11 399.1 13. März 2003 (13.03.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH [DE/DE]; Wilhelm-Johnen-Strasse, 52425 Jülich (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PETERS-WENDISCH, Petra [DE/DE]; Martinusstrasse 2a, 52428 Jülich (DE). NETZER, Roman [DE/DE]; Adolf-Fischer-Strasse 47, 52428 Jülich (DE). EGGLING, Lothar [DE/DE]; Elsenkamp 6, 52428 Jülich (DE). SAHM, Hermann [DE/DE]; Wendelinusstrasse 71, 52428 Jülich (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH; Fachbereich Patente, 52425 Jülich (DE).

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zwei-Buchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WO 2004/081166 A2

(54) Title: NUCLEOTIDE SEQUENCES OF CORYNEFORM BACTERIA CODING FOR PROTEINS INVOLVED IN L-SERINE METABOLISM AND METHOD FOR PRODUCING L-SERINE

(54) Bezeichnung: NUKLEOTIDSEQUENZEN CORYNEFORMER BAKTERIEN CODIEREND FÜR AM L-SERINSTOFF-WECHSEL BETEILIGTE PROTEINE SOWIE VERFAHREN ZUR MIKROBIELLEN HERSTELLUNG VON L-SERIN

(57) Abstract: The invention relates to the nucleotide sequences of coryneform bacteria coding for proteins which are involved in L-serine metabolism with reduced and switched off L-serine dehydratase. Said invention also relates to micro-organisms and to methods for producing L-serine.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Nukleotidsequenzen coryneformer Bakterien codierend für am L-Serinstoffwechsel beteiligte Proteine mit reduzierter bzw. Ausgeschalteter L-Serin-Dehydratase sowie Mikroorganismen und Verfahren zur Herstellung von L-Serin.

## B e s c h r e i b u n g

Nukleotidsequenzen coryneformer Bakterien codierend für am L-Serinstoffwechsel beteiligte Proteine sowie Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von L-Serin

---

Die Erfindung betrifft Nukleotidsequenzen coryneformer Bakterien codierend für am L-Serinstoffwechsel beteiligte Proteine mit reduzierter bzw. ausgeschalteter L-Serin-Dehydratase sowie Mikroorganismen und Verfahren 5 zur Herstellung von L-Serin.

Die Aminosäure L-Serin findet in der Nahrungsmittel-, Futtermittel- und Pharmaindustrie, sowie in der Humanmedizin Anwendung. Darüber hinaus dient sie als Bau- 10 stein für die Synthese weiterer industriell verwertbarer Produkte, wie z. B. L-Tryptophan aus Indol und L-Serin.

Es ist bekannt, dass L-Serin durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien hergestellt werden kann. 15 So ist z. B. ein Stamm von *Corynebacterium glycinophilum* in der Lage, L-Serin aus Glycin und Kohlenhydraten zu bilden (Kubota K, Kageyama K, Shiro T und Okumura S (1971) Journal of General Applications in Microbiology, 17: 167-168; Kubota K, Kageyama K, Maeyashiki I, Yamada K und Okumura S (1972) Journal of General Applications in Microbiology 18: 365). An der Umsetzung von Glycin zu L-Serin ist hier das Enzym L-Serin-Hydroxymethyltransferase beteiligt (Kubota K und Yokozeiki K (1989) Journal of Fermentation and Bioengineering, 67(6):387- 20 25 390). Diese *Corynebacterium glycinophilum* Stämme weisen eine defekte Serindehydratase auf, die durch ungerich-

tete Mutagenese erzeugt wurde (Kubota K (1985) Improved production of L-serin by mutants of *Corynebacterium glycinophylum* with less serine dehydratase activity. *Agricultural Biological Chemistry*, 49:7-12). Diese Enzymaktivität ist Pyridoxal 5'-Phosphat abhängig und nicht molekular charakterisiert (Kubota K., Yokozeiki K, Ozaki H. (1989) Effects of L-serine dehydratase activity on L-serine production by *Corynebacterium glycinophylum* and an examination of the properties of the enzyme. *Agric. Biol. Chem* 49:7-12) Aus dem US Patent 4,528,273 ist ebenfalls ein Verfahren zur Herstellung von L-Serin aus Glycin bekannt, bei dem der Mikroorganismus Serin-Dehydratase negativ ist.

Weiterhin wird L-Serin fermentativ aus Methanol und Glycin unter Zuhilfenahme methylotroper Bakterien, wie z. B. *Hyphomicrobium* Stämmen, produziert (Izumi Y, Yoshida T, Miyazaki SS, Mitsunaga T, Ohshiro T, Shiamo M, Miyata A und Tanabe T (1993) *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39: 427-432). In beiden Fällen muss die Aminosäure Glycin als Vorstufe für die Bildung der Aminosäure L-Serin eingesetzt werden.

Ferner sind coryneformen Bakterien bekannt, die L-Serin direkt aus Kohlenhydraten, ohne zusätzliche Beigabe weiterer Vorstufen produzieren können. Dies ist für eine wirtschaftliche Produktion von L-Serin in industriellem Maßstab vorteilhafter, da L-Serin direkt aus Kohlenhydraten ohne aufwendige Zugabe von Vorstufen hergestellt werden kann. Diese Stämme, die zu der Gattung *Corynebacterium glutamicum* gehören, weisen sich dadurch aus, dass sie z. B. resistent gegen die L-Serin-Analoga Serin-Hydroxamat und  $\beta$ -Chloroalanin sind und durch ungerichtete Mutagenese erhalten wurden.

(Yoshida H und Nakayama K (1974) Nihon-Nogei-Kagaku-kaishi 48: 201-208).

Darüber hinaus sind *Brevibacterium flavum* Stämme be-  
5 kannt, die durch ungerichtete Mutagenese Defekte im  
L-Serin-Abbau aufweisen, eine erhöhte Aktivität der  
durch *serA* kodierten 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase  
besitzen, und die aus *Escherichia coli* stammenden Gene  
*serB* und *serC* überexprimieren (EP0931833A2).

10

Es ist Aufgabe der Erfindung, Maßnahmen zur Verfügung  
zu stellen, die zu einer verbesserten Produktion von  
L-Serin oder davon ableitbaren Stoffwechselprodukten  
wie z. B. Tryptophan führen. Es ist somit Aufgabe der  
15 Erfindung, Nukleinsäuren bereitzustellen, die für am  
L-Serinstoffwechsel beteiligte Proteine codieren, die  
gegenüber in Wild Typ Organismen vorkommenden Proteinen  
einen verringerten bzw. keinen Abbau von L-Serin zu Py-  
ruvat aufweisen. In diesem Zusammenhang ist es weiter-  
20 hin Aufgabe der Erfindung eine L-Serin-Dehydratase so-  
wie Mikroorganismen bereitzustellen, die gegenüber na-  
türlich vorkommenden L-Serin-Dehydratasen bzw. Mikroor-  
ganismen mit einer L-Serin-Dehydratase, einen verrin-  
gerten Abbau von L-Serin aufweisen. Weiterhin ist es  
25 Aufgabe der Erfindung, ein verbessertes Verfahren zur  
mikrobiellen Herstellung von L-Serin bereitzustellen.

Ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 1 wird die Auf-  
gabe erfindungsgemäß gelöst, mit den im kennzeichnenden  
30 Teil des Anspruchs 1 angegebenen Merkmalen. Weiterhin  
wird die Aufgabe ausgehend vom Oberbegriff des An-  
spruchs 7 erfindungsgemäß gelöst, mit den im kennzeich-  
nenden Teil des Anspruchs 7 angegebenen Merkmalen. Die

Aufgabe wird außerdem ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 8 erfindungsgemäß gelöst, mit den im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 8 angegebenen Merkmalen. Die Aufgabe wird ebenso ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 9 erfindungsgemäß gelöst, mit den im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 9 angegebenen Merkmalen. Die Aufgabe wird weiterhin ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 14 erfindungsgemäß gelöst, mit den im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 14 angegebenen Merkmalen. Ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 20 wird die Aufgabe ebenfalls erfindungsgemäß gelöst, durch die im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 20 angegebenen Merkmale. Weiterhin wird die Aufgabe ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 21 erfindungsgemäß gelöst, durch die im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 21 angegebenen Merkmale.

Mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren sowie Polypeptiden ist es nunmehr möglich, eine L-Serin-Dehydratase bereitzustellen, die einen verringerten bzw. keinen L-Serin Abbau mehr verursacht. Weiterhin ist es möglich, Mikroorganismen und Verfahren bereitzustellen, mit denen eine L-Serinproduktion mit gegenüber bisher bekannten mikrobiellen Verfahren höheren Ausbeuten möglich ist.

25

Vorteilhafte Weiterbildungen sind in den Unteransprüchen angegeben.

Gegenstand der Erfindung sind in Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium* replizierbare, gegebenenfalls rekombinante Nukleinsäuren, deren für die L-Serin-Dehydratase, im folgenden auch als SDA bezeichnet, codierende Nukleotidsequenz in Teilen oder komplett dele-

tiert oder mutiert ist oder gegenüber natürlich vorkommenden Nukleotidsequenzen geringer oder gar nicht exprimiert wird.

5 Gegenstand der Erfindung ist weiterhin die Bereitstellung von Nukleinsäuren, deren *sdaA* Gensequenz in Teilen oder komplett deletiert oder mutiert ist oder gegenüber natürlich vorkommenden Nukleotidsequenzen geringer oder gar nicht exprimiert wird. Es erwies sich beispielsweise eine Nukleinsäure mit einer Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID No 1 deren Nukleotide von Position 506 bis 918 teilweise oder komplett deletiert oder mutiert sind oder ein Allel, Homolog oder Derivat dieser Nukleotidsequenz oder mit diesen hybridisierende Nukleotidsequenzen als vorteilhaft. Weiterhin vorteilhaft kann beispielsweise die Deletion oder Mutation des zur Bildung des Eisen-Schwefelclusters erforderliche Cystein enthaltende Sequenzmotivs sein (Hofmeister et al., (1994) Iron-sulfur cluster-containing L-serine dehydratase from *Peptostreptococcus asaccharolyticus*: correlation of the cluster type with enzymatic activity. FEBS Letters 351: 416-418).

10 15 20

Die Wild Typ L-Serin-Dehydratase (*sdaA*) Gensequenz ist allgemein bekannt und kann den dem Fachmann bekannten Datenbanken (NCBI Accession Nr. AP005279) oder dem beigefügten Sequenzprotokoll gemäß SEQ ID No. 1 entnommen werden.

25 30 Die vollständige Deletion des L-Serin-Dehydratase (*sdaA*) -Gens kann beispielsweise durch gerichtete rekombinante DNA-Techniken erreicht werden. Geeignete Methoden dazu sind bei Schäfer et al. (Gene (1994) 145: 69-73) oder auch Link et al. (Journal of Bacteriology

(1998) 179: 6228-6237) beschrieben. Auch können nur Teile des Gens deletiert werden, oder auch mutierte Fragmente des L-Serin-Dehydratase-Gens ausgetauscht werden. Durch Deletion oder Austausch wird so ein Verlust oder eine Reduktion der L-Serin-Dehydratase-Aktivität erreicht. Ein Beispiel für eine derartige Mutante ist der *C. glutamicum* Stamm ATCC13032ΔsdaA, der eine Deletion im sdaA-Gen trägt.

10

Um die Expression des sdaA-Gens zu verhindern oder eine geringere Expression zu erreichen, kann beispielsweise die Promoter- und Regulationsregion, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionsregulationskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch regulierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich die Expression im Verlaufe der fermentativen L-Serin-bildung zu reduzieren. Daneben ist aber auch eine Regulation der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der m-RNA reduziert wird. Des Weiteren können Gene verwendet werden, die für das entsprechende Enzym mit geringer Aktivität kodieren. Alternativ kann weiterhin eine reduzierte Expression des L-Serin-Dehydratase-Gens durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden. Anleitungen findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift EPS 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)),

bei Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)) und in der Patentanmeldung WO 96/15246.

5

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren zeichnen sich dadurch aus, dass sie aus coryneformen Bakterien, bevorzugt der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* besonders bevorzugt aus *Corynebacterium glutamicum* isoliert werden. Beispiele für in Stammkulturen hinterlegte Wild Typen coryneformer Bakterien sind beispielsweise,

10 *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC 13870;  
15 *Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC 15806;  
*Corynebacterium callunae* ATCC 15991;  
*Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032;  
*Brevibacterium divaricatum* ATCC 14020;  
20 *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869;  
*Corynebacterium lilium* ATCC 15990;  
*Brevibacterium flavum* ATCC 14067;  
*Corynebacterium melassecola* ATCC 17965;  
25 *Brevibacterium saccharolyticum* ATCC 14066;  
*Brevibacterium immariophilum* ATCC 14068;  
30 *Brevibacterium roseum* ATCC 13825;  
*Brevibacterium thiogenitalis* ATCC 19240;  
*Microbacterium ammoniaphilum* ATCC 15354;

Beispiele für zur Herstellung von L-Serin geeignete

30 Mutanten oder Produktionsstämme sind, Organismen aus der Gruppe *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Methylobacterium*, *Hyphomycrobium*, *Alcaligenes* oder *Klebsiella*. Die vorliegende Erfindung wird durch die Angabe der

zuvor genannten Bakterienstämme näher charakterisiert, die jedoch nicht limitierend wirkt.

Unter einer Nukleinsäure oder einem Nukleinsäurefrag-  
5 ment ist erfindungsgemäß ein Polymer aus RNA oder DNA zu verstehen, das einzel- oder doppelsträngig sein kann und optional natürliche, chemisch synthetisierte, modifiizierte oder artifizielle Nukleotide enthalten kann. Der Begriff DNA-Polymer schließt hierbei auch genomische DNA, cDNA oder Mischungen davon ein.

Unter Allelen sind erfindungsgemäß funktionell Äquivalente, d. h. im wesentlichen gleichwirkende Nukleotidsequenzen zu verstehen. Funktionell äquivalente Sequenzen sind solche Sequenzen, welche trotz abweichender Nukleotidsequenz, beispielsweise durch die Degenerierung des genetischen Codes bedingt noch die gewünschten Funktionen besitzen. Funktionelle Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z. B. durch chemische Synthese erhaltene und gegebenenfalls an den Kodongebrauch des Wirtsorganismus angepasste Nukleotidsequenzen.

Unter einem funktionellen Äquivalent versteht man insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen einer ursprünglich isolierten Sequenz, welche weiterhin die gewünschte Funktion zeigen. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Inbegriffen sind hier auch sogenannte Sinnmutationen, die auf Proteinebene beispielsweise zum Austausch konserverter Aminosäuren führen können, welche aber zu

keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen und somit funktionsneutral sind. Dies beinhaltet auch Veränderungen der Nukleotidsequenz, die auf Proteinebene den N-Terminus eines Proteins betreffen, ohne jedoch die Funktion des Proteins wesentlich zu beeinträchtigen.

Durch die vorliegende Erfindung werden auch solche Nukleotidsequenzen umfasst, welche man durch Modifikation der Nukleotidsequenz, resultierend in entsprechenden Derivaten, erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann z. B. die weitere Eingrenzung der darin enthaltenen codierenden Sequenz oder z. B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsenzym-Schnittstellen sein.

15

Außerdem sind artifizielle DNA-Sequenzen Gegenstand der vorliegenden Erfindung, solange sie, wie oben beschrieben, die gewünschten Eigenschaften vermitteln. Solche artifiziellen DNA-Sequenzen können beispielsweise durch Rückübersetzung von mittels computergestützten Programmen (molecular modelling) erstellten Proteinen oder durch in-vitro-Selektion ermittelt werden. Besonders geeignet sind codierende DNA-Sequenzen, die durch Rückübersetzung einer Polypeptidsequenz gemäß der für den Wirtsorganismus spezifischen Kodon-Nutzung erhalten wurden. Die spezifische Kodon-Nutzung kann ein mit molekulargenetischen Methoden vertrauter Fachmann durch Computerauswertung anderer, bereits bekannter Gene des zu transformierenden Organismus leicht ermitteln.

30

Unter homologen Sequenzen sind erfindungsgemäß solche zu verstehen, die zu den erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen komplementär sind und/oder mit diesen hybridisieren.

sieren. Der Begriff hybridisierende Sequenzen schließt erfindungsgemäß substanziell ähnliche Nukleotidsequenzen aus der Gruppe von DNA oder RNA ein, die unter an sich bekannten stringenten Bedingungen eine spezifische 5 Wechselwirkung (Bindung) mit den zuvor genannten Nukleotidsequenzen eingehen. Hierzu zählen auch kurze Nukleotidsequenzen mit einer Länge von beispielsweise 10 bis 30, bevorzugt 12 bis 15 Nukleotiden. Dies umfasst erfindungsgemäß u.a. auch sogenannte Primer oder Sonden.

10

Erfindungsgemäß sind auch die den codierenden Bereichen (Strukturgenen) vorausgehenden (5'-oder upstream) und/oder nachfolgenden (3'-oder downstream) Sequenzbereiche eingeschlossen. Insbesondere sind hierin Sequenzbereiche mit regulatorischer Funktion inbegriffen. Sie können die Transkription, die RNA-Stabilität oder die RNA Prozessierung sowie die Translation beeinflussen. Beispiele für regulatorische Sequenzen sind u.a. Promotoren, Enhancer, Operatoren, Terminatoren oder 15 Translationsverstärker.

Gegenstand der Erfindung ist ferner eine Genstruktur, enthaltend wenigstens eine der zuvor beschriebenen Nukleotidsequenzen sowie mit diesen operativ verknüpfte 25 regulatorische Sequenzen, welche die Expression der codierenden Sequenzen in der Wirtszelle steuern.

Darüber hinaus betrifft die vorliegende Erfindung einen Vektor enthaltend eine Nukleotidsequenz der zuvor 30 beschriebenen Art, mit diesen operativ verknüpfte regulatorische Nukleotidsequenzen sowie zusätzliche Nukleotidsequenzen zur Selektion transformierter Wirtszellen, für die Replikation innerhalb der Wirtszelle oder zur In-

tegration in das entsprechende Wirtszell-Genom. Ferner kann der erfindungsgemäße Vektor eine Genstruktur der vorgenannten Art enthalten.

Als Vektoren eignen sich solche, die in coryneformen

5 Bakterien repliziert werden wie z. B. pZ1 (Menkel E, Thierbach G, Eggeling L, Sahm H., 1989, *Appl Environ Microbiol* 55(3): 684-688), pEKEx2 (Eikmanns et al., Gene 102: 93-98 (1991), oder pXMJ19 (Jacoby M., Burkovski A (1999) Construction and application of new Corynebacterium glutamicum vectors. *Biotechnol. Technique* 13: 437-441). Andere Plasmidvektoren können in gleicher Weise verwendet werden. Diese Aufzählung ist für die vorliegende Erfindung jedoch nicht limitierend.

10

15 Unter Ausnutzung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen können entsprechende Sonden oder auch Primer synthetisiert und dazu verwendet werden, beispielsweise mit Hilfe der PCR-Technik analoge Gene aus anderen Mikroorganismen, bevorzugt coryneformen Bakterien zu

20 amplifizieren und isolieren.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit auch eine Sonde zur Identifizierung und/oder Isolierung von Genen codierend für an der Biosynthese von L-Serin beteiligte Proteine, wobei diese Sonde ausgehend von den erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen der zuvor beschriebenen Art hergestellt wird und eine zur Detektion geeignete Markierung enthält. Bei der Sonde kann es sich um einen Teilausschnitt der erfindungsgemäßen Sequenz, beispielsweise aus einem konservierten Bereich handeln, der z. B. eine Länge von 10 bis 30 oder bevorzugt 12 bis 15 Nukleotiden aufweist und unter stringenteren Bedingungen spezifisch mit homologen Nukleotidse-

25

30

quenzen hybridisieren kann. Geeignete Markierungen sind aus der Literatur zahlreich bekannt. Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem beispielsweise im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: a practical approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994) oder beispielsweise im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260).

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner eine L-Serin-Dehydratase mit gegenüber der Wild Typ L-Serin-Dehydratase verringertem L-Serinabbau, codiert durch eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder deren Variationen der zuvor beschriebenen Art. Die vorliegende Erfindung betrifft ebenso eine L-Serin-Dehydratase, bzw. ein L-Serin-Dehydratase Mutein, mit einer Aminosäuresequenz gemäß der SEQ ID No 2 deren Aminosäuren von Position 135 bis 274, beispielsweise als Folge einer gerichteten Mutagenese auf DNA-Ebene, verändert wurden oder einer modifizierten Form dieser Polypeptidsequenzen oder Isoformen davon oder Mischungen daraus.

Unter „verändert“ wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung das komplette oder teilweise Entfernen oder Austauschen der Aminosäuren von Position 135 bis 274 verstanden.

Unter Isoformen sind Enzyme mit gleicher oder vergleichbarer Substrat- und Wirkungsspezifität zu verstehen, die jedoch eine unterschiedliche Primärstruktur aufweisen.

Unter modifizierten Formen sind erfindungsgemäß Enzyme zu verstehen, bei denen Änderungen in der Sequenz, beispielsweise am N-Terminus oder C-Terminus des Polypeptides oder im Bereich konservierter Aminosäuren vorliegen, ohne jedoch die Funktion des Enzyms zu beeinträchtigen. Diese Veränderungen können in Form von Aminosäureaustauschen nach an sich bekannten Methoden vorgenommen werden.

10

Die erfindungsgemäßen Polypeptide zeichnen sich dadurch aus, dass sie aus coryneformen Bakterien, bevorzugt der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium*, besonders bevorzugt der Art *Corynebacterium glutamicum* oder *Brevibacterium* besonders bevorzugt aus *Corynebacterium glutamicum* stammen. Beispiele für in Stammkulturen hinterlegte Wild Typen coryneformer Bakterien sind beispielsweise

*Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC 13870;  
20 *Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC 15806;  
*Corynebacterium callunae* ATCC 15991;  
*Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032;  
*Brevibacterium divaricatum* ATCC 14020;  
*Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869;  
25 *Corynebacterium lilium* ATCC 15990;  
*Brevibacterium flavum* ATCC 14067;  
*Corynebacterium melassecola* ATCC 17965;  
*Brevibacterium saccharolyticum* ATCC 14066;  
*Brevibacterium immariophilum* ATCC 14068;  
30 *Brevibacterium roseum* ATCC 13825;  
*Brevibacterium thiogenitalis* ATCC 19240;  
*Microbacterium ammoniaphilum* ATCC 15354;

Beispiele für zur Herstellung von L-Serin geeignete Mutanten oder Produktionsstämme sind Organismen aus der Gruppe *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Methylobacterium*, *Hyphomicrobium*, *Alcaligenes* oder *Klebsiella*.

5 Die vorliegende Erfindung wird durch die Angabe der zuvor genannten Bakterienstämme näher charakterisiert, die jedoch nicht limitierend wirkt.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Mikroorganismus, dadurch gekennzeichnet, dass die für die L-Serin-Dehydratase codierende Nukleotidsequenz in Teilen oder komplett deletiert oder mutiert ist oder gegenüber den natürlich vorkommenden Nukleotidsquenzen geringer oder gar nicht exprimiert

15 wird.

Die Erfindung betrifft weiterhin einen Mikroorganismus, der dadurch gekennzeichnet ist, dass das *sdaA*-Gen in Teilen oder komplett deletiert oder mutiert ist oder gegenüber den natürlich vorkommenden *sdaA*-Genen geringer oder gar nicht exprimiert wird.

Ebenso umfasst die vorliegende Erfindung einen genetisch veränderten Mikroorganismus enthaltend in replizierbarer Form eine Genstruktur oder einen Vektor der zuvor beschriebenen Art.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist darüber hinaus auch ein genetisch veränderter Mikroorganismus enthaltend ein erfindungsgemäßes Polypeptid der zuvor beschriebenen Art, welches im Vergleich zu dem entsprechend nicht genetisch veränderten Mikroorganismus einen verringerten bzw. keinen L-Serin Abbau aufweist.

Ein erfindungsgemäß genetisch veränderter Mikroorganismus zeichnet sich ferner dadurch aus, dass er ein coryneformes Bakterium, bevorzugt der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium*, besonders bevorzugt der Spezies *Corynebacterium glutamicum* oder *Brevibacterium flavum* ist.

5 Prinzipiell können Gene durch an sich bekannte Methoden, wie beispielsweise die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) mit Hilfe von kurzen, synthetischen Nukleotidsequenzen (Primern) amplifiziert und anschließend isoliert werden. Die Herstellung der verwendeten Primer erfolgt im Allgemeinen anhand bekannter Gensequenzen aufgrund bestehender Homologien in konservierten Bereichen der Gene und/oder unter Berücksichtigung des GC-10 Gehalts der DNA des zu untersuchenden Mikroorganismus.

15

Eine weitere Vorgehensweise zur Isolierung von codierenden Nukleotidsequenzen ist die Komplementation von 20 sogenannten Defekt-Mutanten des zu untersuchenden Organismusses, die zumindest phänotypisch einen Funktionsverlust in der Aktivität des zu untersuchenden Gens oder entsprechenden Proteins aufweisen. Unter einer Komplementation ist die Aufhebung des Gendefektes der 25 Mutante und weitgehende Wiederherstellung des ursprünglichen Erscheinungsbildes vor der Mutagenese zu verstehen, die durch die Einbringung funktioneller Gene oder Genfragmente aus dem zu untersuchenden Mikroorganismus erreicht wird.

30

Ein klassisches Mutagenese-Verfahren zur Herstellung von Defektmutanten bzw. von Mutanten mit einer reduzierten oder ausgeschalteten L-Serin-Dehydratase, ist

beispielsweise die Behandlung der Bakterienzellen mit Chemikalien wie z. B.

N-Methyl-N-Nitro-N-Nitrosoguanidin oder UV-Bestrahlung.

Derartige Verfahren zur Mutationsauslösung sind all-

5 gemein bekannt und können unter anderem bei Miller (A Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992)) oder im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington 10 D.C., USA, 1981) nachgelesen werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft darüber hinaus ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von L-Serin, wo-

15 bei die für die L-Serin-Dehydratase codierende Nukleinsäure in einem Mikroorganismus in Teilen oder komplett deletiert oder mutiert wird oder gegenüber natürlich vorkommenden Nukleinsäuren gar nicht oder geringer exprimiert wird, dieser genetisch veränderte Mikroorganismus zur mikrobiellen Herstellung von L-Serin eingesetzt wird und das entsprechend gebildete L-Serin aus dem Kulturmedium isoliert wird.

Die erfindungsgemäß hergestellten genetisch veränderten

25 Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch-Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von L-Serin kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren

und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muss in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlenhydrate wie z. B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Stickstoffquelle können organische stickstoffhaltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden natriumhaltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muss weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z. B. Magnesiumsulfat oder Eisen-sulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können

überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzu gegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

5 Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaum-

10 mittel wie z. B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe z. B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrecht zu erhalten werden Sauerstoff oder

15 sauerstoffhaltige Gasmischungen wie z. B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird so lange fortgesetzt, bis sich ein Maximum an L-Serin gebildet hat. Dieses

20 Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Die Analyse der L-Serin-Bildung kann durch Anionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin

25 Derivatisierung erfolgen so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben, oder sie kann durch reversed Phase HPLC erfolgen so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

30

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Serin aus Glucose, Saccharose, Lactose, Mannose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke,

Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um die zuvor bereits näher beschriebenen Vertreter coryneformer Bakterien handeln. Eine Auswahl an Ergebnissen der Fermentation ist in Tabelle 1 dargestellt. Hierbei zeichnen sich die erfindungsgemäß genetisch veränderten Mikroorganismen durch eine wesentlich verbesserte L-Serin-Produktion gegenüber den entsprechend nicht transformierten Mikroorganismen (Wild Typen) oder den Mikroorganismen aus, die lediglich den Vektor ohne Gen-Insert enthalten. In einer besonderen Ausführungsvariante der vorliegenden Erfindung ist gezeigt, daß *C. glutamicum* ATCC 13032ΔpanBCΔsdaA zu einer wenigstens 4-fachen Steigerung der L-Serin Akkumulation im Medium im Vergleich zu den Kontrollstämmen führt (Tab. 1). Durch die gemeinsame Überexpression weiterer Gene, die positiv auf den L-Serinbiosyntheseweg wirken, konnte eine 16-fache Steigerung der L-Serin-Produktion erreicht werden.

Unter Aminosäure-Produktionsstämmen sind im Sinne der vorliegenden Erfindung *Corynebacterium glutamicum*-Stämme oder homologe Mikroorganismen zu verstehen, die durch klassische und/oder molekulargenetische Methoden derart verändert sind, dass ihr Stoffwechselfluss verstärkt in die Richtung der Biosynthese von Aminosäuren oder deren Abkömmlingen verläuft (metabolic engineering). Beispielsweise sind bei diesen Aminosäure-Produktionsstämmen ein oder mehrere Gen(e) und/oder die korrespondierenden Enzyme, die an entscheidenden und entsprechend komplex regulierten Schlüsselpositionen des Stoffwechselweges (Flaschenhals) stehen in ihrer Regulation verändert oder sogar dereguliert. Die vorliegende Erfindung umfasst hierbei sämtliche bereits

bekannte Aminosäure-Produktionsstämme, bevorzugt der Gattung *Corynebacterium* oder homologer Organismen. Ferner sind erfindungsgemäß auch diejenigen Produktionsstämme umfaßt, die der Fachmann in Analogie zu Erkenntnissen aus anderen Mikroorganismen, beispielsweise Enterobacterien, *Bacillaceen* oder Hefe-Arten nach gängigen Methoden herstellen kann.

Die Figuren zeigen beispielhaft verwendete Plasmide sowie experimentelle Ergebnisse nach Einsatz der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren bzw. Mikroorganismen

Es zeigt:

Fig. 1: Integrationsplasmid pK19mobsacB-DeltasdaA  
Die am äußeren Rand des Plasmids angegebenen Markierungen kennzeichnen die jeweiligen Restriktionsschnittstellen. Die im Inneren des Kreises angegebenen Abschnitte kennzeichnen folgende Gene:

kan	Kanamycinresistenz
sacB	Sucrase
OriT	Transfer-Origin
sda <sup>~</sup>	5'-Ende des sdaA Gens
sda <sup>''</sup>	3'-Ende des sdaA Gens

Fig. 2: Wachstumsverhalten (quadratische Symbole) und L-Serin-Abbau (kreisförmige Symbole) von *C. glutamicum* 13032ΔpanBCΔsdaA, Klon 1 (□, ○) und *C. glutamicum* 13032ΔpanBCΔsdaA, Klon 2 (■, ●) im Vergleich zu *C. glutamicum* 13032ΔpanBC, Klon 1 (□, ○) und *C. glutamicum* 13032ΔpanBC, Klon 2 (■, ●). Die Abszisse X

5

gibt die Fermentationszeit in Stunden [h] an. Die Ordinate  $Y_1$  gibt das Wachstum der Mikroorganismen gemessen als optische Dichte (OD) bei 600 nm an. Die Ordinate  $Y_2$  gibt die L-Serinkonzentration in mM an.

10

Fig. 3: Expressionsplasmid pEC-T18mob2-serA<sup>fbr</sup>CB. Die am äußeren Rand des Plasmids angegebenen Markierungen kennzeichnen die jeweiligen Restriktionsschnittstellen. Die im Inneren des Kreises angegebenen Abschnitte kennzeichnen folgende Gene:

15

SerC	Phosphoserin Transaminase
SerB	Phosphoserin Phosphatase
Rep	Replikationsursprung
Per	Partition Zellverteilungsgen
Tet	Tetracyclinresistenzgen
RP4-mob	Mobilisationsursprung
OriV	Ursprung der DNA Replikation
SerA-fbr	3-Phosphoglycerat Dehydrogenase

20

#### Ausführungsbeispiele:

25

1. Konstruktion einer sdaA-Deletionsmutante von *C. glutamicum* ATCC13032  $\Delta$ panBC

30

*Corynebacterium glutamicum* verfügt über eine Nukleotidsequenz (Genbank-Accession-Nummer BAB99038; SEQ-ID-No. 1) dessen abgeleitete Polypeptid-Sequenz 40 % Identität zur beschriebenen L-Serin-Dehydratase von *E. coli* aufweist (NCBI-Accession-Nummer P16095). Durch gengerichtete Mutagenese nach einer Methode von Link et al. (Link AJ, Phillips D, Church GM. Methods for generating

precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *J Bacteriol.* 1997 Oct;179(20):6228-37)

5 und Schäfer et al. (Gene 145: 69-73 (1994)) wurde das *sdaA*-Gen von *C. glutamicum* deletiert. Hierzu wurden folgende Primer von der corynebakteriellen *sdaA*-Sequenz (NCBI Accession-Nummer AP005279) abgeleitet:

10 *sdaA-1*: 5'-TCGTGCAACTTCAGACTC-3'  
(AP005279 Nukleotid 73635 - 73653);

*sdaA-2*: 5'-**CCCATCCACTAAACCTTAAACACACGT**CATAATGAACCCACC-3'  
(AP005279 komplementär zu Nukleotid 74121-74139);

15 *sdaA-3*: 5'-**TGTTTAAGTTAGTGGATGGGCCGACTAATGGTGCTGCG**-3'  
(AP005279 komplementär zu Nukleotid 74553 - 74571);

20 *sdaA-4*: 5'-CGGGAAGCCCAAGGTGGT-3'  
(AP005279 Nukleotid 75044 - 75062)

Primer *sdaA-1* und *sdaA-2* flankieren jeweils den Beginn und das Ende des *sdaA*-Gens. Die Primer *sdaA-2* und *sdaA-3* verfügen über jeweils komplementäre Linker-Regionen (hervorgehobener Text), die es ermöglichen in einem zweistufigen PCR-Ansatz (Cross-over PCR) eine Deletion in dem *sdaA*-Gen *in vitro* zu erzeugen. In einer ersten PCR-Reaktion mit chromosomaler DNA von *C. glutamicum* wurden jeweils die Primer-Kombinationen *sdaA-1* und  
25 *sdaA-2* sowie *sdaA-3* und *sdaA-4* eingesetzt. Die PCR-Reaktion wurde in 30 Zyklen in Gegenwart von 200 µM Deoxynukleotidtriphosphaten (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), je 600 nM der entsprechenden Oligonukleotide *sdaA-1* und  
30 *sdaA-2* sowie *sdaA-3* und *sdaA-4* eingesetzt. Die PCR-Reaktion wurde in 30 Zyklen in Gegenwart von 200 µM Deoxynukleotidtriphosphaten (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), je 600 nM der entsprechenden Oligonukleotide *sdaA-1* und

sdaA-4 sowie 60 nM der Oligonukleotide sdaA-2 und sdaA-3, 100 ng chromosomaler DNA von *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, 1/10 Volumen 10-fach Reaktionspuffer und 2,6 Einheiten einer hitzestabilen Taq-/Pwo-DNA-Polymerase-Mischung (Expand High Fidelity PCR System der Firma Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) in einem Thermocycler (PTC-100, MJ Research, Inc., Watertown, USA) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 94°C für 30 Sekunden, 50°C für 30 Sekunden und 72°C für 10 Sekunden. Der Elongationsschritt bei 72°C wurde nach 10 Zyklen um 5 Sekunden pro Zyklus verlängert. Nach der PCR-Reaktion wurden die erhaltenen DNA-Fragmente, die jeweils eine Länge von 500 bp aufwiesen mit dem QIAExII Gelextraktionskit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aus einem 0,8 %igen Agarose-Gel isoliert, und beide Fragmente wurden als Template in die zweite PCR eingesetzt. Als Primer wurden nun die Primer sdaA-1 und sdaA-4 eingesetzt. Diesmal erfolgte die Reaktion in 35 Zyklen in Gegenwart von 200 μM Deoxynukleotidtriphosphaten, je 600 nM des entsprechenden Oligonukleotids, jeweils 20 ng der isolierten Template-DNA aus der ersten PCR, 1/10 Volumen 10-fach Reaktionspuffer und 2,6 Einheiten der Taq-/Pwo-DNA-Polymerase-Mischung unter folgenden Bedingungen: 94°C für 30 Sekunden, 50°C für 30 Sekunden und 72°C für 80 Sekunden. Wiederum wurde der Elongationsschritt nach 10 Zyklen um jeweils 5 Sekunden verlängert. Nach der PCR-Reaktion wurde das erhaltene 1000 bp lange DNA-Fragment, dass nun das inaktivierte sdaA-Gen mit einer 420 bp langen zentralen Deletion beinhaltet, aus einem 0,8 %igen Agarose-Gel isoliert, und blunt-end mit Hilfe des Sure Clone-Kits (Amersham Pharmacia Biotech) in die *Sma*I-Schnittstelle des Inaktivierungsvektors pK19mobsacB (Schäfer et al.

Gene 145: 69-73 (1994), der nur in *E. coli*, nicht aber in *C. glutamicum* replizieren kann, kloniert. Das erhaltene Plasmid pK19mobsacB<sub>Δ</sub>sdaA (Fig. 1) wurde durch Restriktionskartierung auf Richtigkeit überprüft. Die 5 Klonierung erfolgte in dem *Escherichia coli* Stamm DH5 $\alpha$ mcr (Grant et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA (1990) 87: 4645-4649).

Anschließend wurde das Plasmid durch Elektroporation in 10 *C. glutamicum* 13032 $\Delta$ panBC (Radmacher E, Vaitsikova A, Burger U, Krumbach K, Sahm H, Eggeling L. Linking central metabolism with increased pathway flux: L-valine accumulation by *Corynebacterium glutamicum*. Appl Environ Microbiol. 2002 68(5):2246-50) eingebracht und auf 15 Integration des Vektors selektioniert. Dieser Stamm ist durch die Deletion der Pantothenat-Biosynthese Gene *panB* und *panC* Pantothenat-auxotroph, und zeichnet sich dadurch aus, dass er unter Pantothenat-Limitation aufgrund einer verstärkten Akkumulation von Pyruvat ca. 50 20 mM Alanin und 8 mM Valin ausscheidet. Darüber hinaus bildet der Stamm ca. 100  $\mu$ M L-Serin und eignet sich somit als Ausgangsstamm für die Konstruktion eines L-Serinproduzenten. Es wurden Kanamycin-resistente Klone von *C. glutamicum* 13032 $\Delta$ panBC erhalten, bei denen 25 der Inaktivierungsvektor im Genom integriert vorlag. Um auf die Excision des Vektors zu selektionieren, wurden Kanamycin-resistente Klone auf Saccharose-haltigem LB-Medium ((Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press) mit 15 g/l Agar, 2% Glucose/ 10% Saccharose) 30 ausplattiert und Kolonien erhalten, welche den Vektor durch ein zweites Rekombinationsereignis wieder verloren haben (Jäger et al. 1992, Journal of Bacteriology

174: 5462-5465). Zwei dieser Klone, deren Nukleotide des *sdaA*-Gens von Position 506 bis 918 deletiert waren und fortan mit 13032 $\Delta$ panBC $\Delta$ sdaA, Klon 1 und 13032 $\Delta$ panBC $\Delta$ sdaA, Klon 2 bezeichnet werden, wurden für 5 die weiteren Untersuchungen verwendet.

## 2. Einfluss der *sdaA*-Deletion auf den L-Serin-Abbau

10 Im Folgenden wurde getestet, ob das deletierte *sdaA*-Gen tatsächlich am L-Serin-Abbau beteiligt ist. Hierzu wurde ein Wachstumsexperiment mit jeweils zwei Klonen des Stamms *C. glutamicum* 13032 $\Delta$ panBC $\Delta$ sdaA im Vergleich zum Stamm *C. glutamicum* 13032 $\Delta$ panBC auf Minimalmedium (Keilhauer et al., Journal of Bacteriology 175 (1993) 15 5595-5603) das zusätzlich 2 % Glucose, 1  $\mu$ M Pantothenat und 100 mM L-Serin enthielt durchgeführt. Es wurde das Wachstum und der Verbrauch von L-Serin verfolgt. Das Ergebnis ist in Fig. 2 dargestellt.

20 Das Ergebnis in Fig. 2 zeigt, dass die Deletion des *sdaA*-Gens zu einem ca. 40 % verringerten Abbau von L-Serin führt.

## 25 3. Einfluss der Deletion des *sdaA*-Gens auf die L-Serin-Bildung

Um zu testen, welchen Einfluss die Deletion des L-Serin-Dehydratase-Gens auf die L-Serin-Bildung hat, 30 wurden die Stämme 13032 $\Delta$ panBC $\Delta$ sdaA (Klon 1, Klon 2) und 13032 $\Delta$ panBC (Klon 1, Klon 2) mit dem Plasmid pEC-T18mob2-*serA*<sup>fbr</sup>*serCserB* transformiert. Das Plasmid (Fig. 3) setzt sich zusammen aus dem Vektor pEC-T18mob2

(Tauch, A., Kirchner, O., Loffler, B., Gotker, S., Puhler, A. and Kalinowski, J. Efficient Electroporation of *Corynebacterium diphtheriae* with a Mini-Replicon Derived from the *Corynebacterium glutamicum* Plasmid pGA1. *Curr. Microbiol.* 45 (5), 362-367 (2002)), den corynebacteriellen Genen *serA*<sup>fbr</sup> (Peters-Wendisch P, Netzer R, Eggeling L, Sahm H. 3-Phosphoglycerate dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum*: the C-terminal domain is not essential for activity but is required for inhibition by L-serine. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2002 Dec;60(4):437-41), sowie *serC* und *serB* (deutsche Patentanmeldung 100 44 831.3, 11.09.2000). Nach erfolgter Elektroporation wurden die Stämme 13032ΔpanBCΔsdaApserA<sup>fbr</sup>CB und 13032ΔpanBCpserA<sup>fbr</sup>CB erhalten. Zur Untersuchung der L-Serinausscheidung wurden die zwei Stämme 13032ΔpanBCΔsdaApserA<sup>fbr</sup>CB und 13032ΔpanBCpserA<sup>fbr</sup>CB in Komplexmedium (CgIII mit 2% Glukose und 5 µg/l Tetracyclin) gezüchtet, und das Fermentationsmedium CGXII (*J Bacteriol* (1993) 175: 5595-5603) jeweils aus den Vorkulturen beimpft. Das Medium enthielt zusätzlich 50 µg/l Kanamycin und 1 µM Pantothenat. Als Kontrolle wurden die beiden Ausgangsstämme 13032ΔpanBC und 13032ΔpanBCΔsdaA in gleicher Weise kultiviert, allerdings enthielten die Medien kein Tetracyclin b. Es wurden je mindestens zwei unabhängige Fermentationen durchgeführt. Nach Kultivierung für 30 Stunden bei 30°C auf dem Rotationsschüttler bei 120 Upm wurde die in das Medium akkumulierte L-Serinmenge bestimmt. Die Bestimmung der Aminosäurekonzentration erfolgte mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (*J Chromat* (1983) 266: 471-482). Das Ergebnis der Fermentation ist in Tabelle 1 dargestellt, und es zeigt sich, daß das Ausschalten der L-Serin-Dehydratase zu einer 4-

fachen Steigerung der L-Serin-Akkumulation im Medium führt, unabhängig davon, ob die L-Serin-Biosynthesegene *serA<sup>fbr</sup>*, *serC* und *serB* überexprimiert werden. Die Überexpression der L-Serin-Biosynthesegene *serA<sup>fbr</sup>*, *serC* und *serB* führt jedoch generell zu einer 16-fachen Steigerung der L-Serin-Akkumulation im Kulturüberstand. Somit stellt die Nutzung der konstruierten und beschriebenen Deletionsmutante  $\Delta$ sdaA ein Verfahren dar, um die L-Serinbildung entscheidend zu verbessern.

10

Tabelle 1: Akkumulation von L-Serin im Kulturüberstand von *Corynebacterium glutamicum* 13032 $\Delta$ panBC und 13032 $\Delta$ panBC $\Delta$ sdaA nach Expression der Gene *serA<sup>fbr</sup>*, *serC* und *serB*.

Stamm	OD <sub>600</sub>	L-Serin [mM]
13032 $\Delta$ panBC	40	0,1
13032 $\Delta$ panBC $\Delta$ sdaA	42	0,4
13032 $\Delta$ panBC $\Delta$ serA <sup>fbr</sup> CB	30	1,6
13032 $\Delta$ panBC $\Delta$ sdaA $\Delta$ serA <sup>fbr</sup> CB	30	6,6

#### 4. Bestimmung der L-Serin-Dehydratase-Aktivität

Zur Bestimmung der L-Serin Dehydratase-Aktivität wurde der Wildtypstamm WT pXMJ19 (Jacoby M., Burkovski A (1999) Construction and application of new *Corynebacterium glutamicum* vectors. Biotechnol. Technique 13: 437-441), der Überexpressionsstamm WT pXMJ19\_sdaA und der Deletionsstamm  $\Delta$ sdaA pXMJ19 in CgXII-Minimalmedium wie bei Keilhauer et al., (1993) beschrieben angezogen. Das Medium enthielt 30 mg/l Protokatechusäure, 100 mM Glu-

kose und 100 mM L-Serin. Die Zellen wurden in Anwesenheit von 1 mM Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase bei einer optischen Dichte von 6-8, gemessen am Spektralphotometer Pharmacia Biotech ultrospec 3000, geerntet. Anschließend wurden sie 10 min bei 4500 rpm und 4°C abzentrifugiert, in 50 mM N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure-Puffer (pH 8,0) respundiert, und erneut zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 50 mM N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure-Puffer (pH 8,0), 1 mM FeSO<sub>4</sub> und 10 mM Dithiothreitol aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschallbehandlung (Branson sonifier 250, duty cycle 25%, output control 2,5, 10 Minuten) auf Eis. Zur Bestimmung der L-Serin Dehydratase-Aktivität enthielt der Reaktionsansatz 50 mM N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure-Puffer (pH 8,0), 10 mM Dithiothreitol und 10-100 µl Rohextrakt. Der Nachweis des aus dem Serin gebildeten Pyruvats erfolgte wie beschrieben (Ohmori et al., 1991). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 mM L-Serin gestartet und nach 10 Minuten durch Zugabe von 1,2-Diamino-4,5-dimethoxybenzol Reagenz im Verhältnis 1:1 gestoppt. Das Reagenz bestand, wie bei Ohmori et al., 1991 beschrieben, aus 4 mg 1,2-Diamino-4,5-dimethoxybenzol in 42,4 ml H<sub>2</sub>O, 3,5 ml β-Mercaptoethanol und 4,1 ml HCl (37%ig) gelöst. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 2 h bei 102°C trockener Hitze. Der Nachweis und die Quantifizierung des aus dem Pyruvat entstandenen 2-Hydroxy-6,7-dimethoxy-3-methylquinoxalin-Derivats erfolgte mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie, ebenfalls wie beschrieben (Ohmori et al., 1991). Die Proteinbestimmung im Rohextrakt erfolgte mittels eines auf der Bradford-

Methode (Bradford, 1976) beruhenden Protein Assays (Fa. Bio-Rad). Die ermittelten spezifischen L-Serin Dehydratase-Aktivitäten der drei Stämme sind in Tabelle 2 angegeben.

5 Tabelle 2: Spezifische Aktivität der L-Serin Dehydratase in den Stämmen 13032 WT pXMJ19\_sdaA (Überexprimierer), 13032 WT pXMJ19 (Wildtyp mit Leervektor) und 13032 ΔsdaA pXMJ19 (Deletionsmutante mit Leervektor) unter induzierenden Bedingungen.

C. glutamicum Stamm	spez. Aktivität [nmol/min*mg]
13032 WT pXMJ19_sdaA	0,221
13032 WT pXMJ19	0,003
13032 ΔsdaA pXMJ19	0

## P a t e n t a n s p r ü c h e

---

1. In Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium* rep-  
lizierbare, gegebenenfalls rekombinante Nukleinsäu-  
ren,  
dadurch gekennzeichnet,  
5 dass die für die L-Serin-Dehydratase codierende  
Nukleotidsequenz in Teilen oder komplett deletiert  
oder mutiert ist oder gegenüber natürlich vorkom-  
menden Nukleotidsequenzen geringer oder gar nicht  
exprimiert wird.
- 10 2. Nukleinsäuren nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass die sdaA-Gensequenz in Teilen oder komplett  
deletiert oder mutiert ist oder gegenüber natürlich  
vorkommenden Nukleotidsequenzen geringer oder gar  
15 nicht exprimiert wird.
- 15 3. Nukleinsäuren nach einem der Ansprüche 1 bis 2,  
gekennzeichnet durch eine Nukleotidsequenz gemäß  
SEQ ID No 1, deren Nukleotide von Position 506 bis  
918 komplett oder teilweise deletiert oder mutiert  
20 sind oder ein Allel, Homolog oder Derivat dieser  
Nukleotidsequenz oder mit diesen hybridisierende  
Nukleotidsequenzen.
- 25 4. Nukleinsäuren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass sie aus coryneformen Bakterien isoliert wer-  
den.
5. Nukleinsäuren nach einem der Ansprüche 1 bis 4,  
dadurch gekennzeichnet,

dass sie aus Corynebacterium oder Brevibacterium isoliert werden.

6. Nukleinsäuren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet,
- 5       dass sie aus Corynebacterium glutamicum oder Brevibacterium flavum isoliert werden.
7. Genstruktur enthaltend wenigstens eine Nukleotidsequenz gemäß den Ansprüchen 1 bis 6 sowie mit diesen operativ verknüpfte regulatorische Sequenzen.
- 10      8. Vektor enthaltend wenigstens eine Nukleotidsequenz gemäß Anspruch 1 bis 6 oder eine Genstruktur gemäß Anspruch 7 sowie zusätzliche Nukleotidsequenzen zur Selektion, zur Replikation in der Wirtszelle oder zur Integration in das Wirtszell-Genom.
- 15      9. L-Serin-Dehydratase mit reduzierter L-Serin-Dehydrataseaktivität, codiert durch eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6.
10. L-Serin-Dehydratase nach Anspruch 9, mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO 2 deren 20     Aminosäuren von Position 135 bis 274 verändert sind, oder eine modifizierte Form dieser Polypeptidsequenz oder Isoform davon.
11. L-Serin-Dehydratase gemäß einem der Ansprüche 9 bis 10, 25     dadurch gekennzeichnet, dass sie aus coryneformen Bakterien stammt.
12. L-Serin-Dehydratase gemäß einem der Ansprüche 9 bis 11,     dadurch gekennzeichnet,

dass sie aus *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* stammt.

13. L-Serin-Dehydratase gemäß einem der Ansprüche 9 bis 12,

5 dadurch gekennzeichnet,

dass sie aus *Corynebacterium glutamicum* oder *Brevibacterium flavum* stammt.

14. Mikroorganismus

dadurch gekennzeichnet,

10 dass die für eine L-Serin-Dehydratase codierende Nukleotidsequenz, in Teilen oder komplett deletiert oder mutiert ist oder gegenüber den natürlich vorkommenden Nukleotidsequenzen geringer oder gar nicht exprimiert wird.

15 15. Mikroorganismus nach Anspruch 14,

dadurch gekennzeichnet,

dass das *sdaA*-Gen in Teilen oder komplett deletiert oder mutiert ist oder gegenüber den natürlich vorkommenden *sdaA*-Genen geringer oder gar nicht exprimiert wird.

20

16. Mikroorganismus gemäß einem der Ansprüche 14 bis 15, enthaltend in replizierbarer Form eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, eine Genstruktur gemäß Anspruch 7, einen Vektor gemäß Anspruch 8 oder ein Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 9 bis 13.

25

17. Mikroorganismus gemäß einem der Ansprüche 14 bis 16, dadurch gekennzeichnet,  
dass er ein coryneformes Bakterium ist.

18. Mikroorganismus gemäß einem der Ansprüche 14 bis 17,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass er zur Gattung Corynebacterium oder Brevibacterium gehört.  
5
19. Mikroorganismus gemäß einem der Ansprüche 14 bis 18,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass er zu Corynebacterium glutamicum oder Brevibacterium flavum gehört.  
10
20. Sonde zur Identifizierung und/oder Isolierung von Genen codierend für an der Biosynthese von L-Serin beteiligten Proteinen, dadurch gekennzeichnet,  
dass sie ausgehend von Nukleinsäuren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 hergestellt wird und eine zur Detektion geeignete Markierung enthält.  
15
21. Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von L-Serin, dadurch gekennzeichnet, dass
  - a) die für die L-Serin-Dehydratase codierende Nukleinsäure in einem Mikroorganismus in Teilen oder komplett deletiert oder mutiert wird oder gegenüber natürlich vorkommenden Nukleinsäuren gar nicht oder geringer exprimiert wird,  
20
  - b) dieser genetisch veränderte Mikroorganismus aus Schritt a) zur mikrobiellen Herstellung eingesetzt wird und  
25
  - c) das gebildete L-Serin aus dem Kulturmedium isoliert wird.

22. Verfahren nach Anspruch 21,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass die sdaA-Gensequenz in Teilen oder komplett  
deletiert oder mutiert wird oder gegenüber natür-  
lich vorkommenden Nukleotidsequenzen geringer oder  
gar nicht exprimiert wird.
- 5
23. Verfahren nach einem der Ansprüche 21 bis 22,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass die Nukleotide gemäß SEQ ID No 1 von Position  
10 506 bis 918 komplett oder in Teilen deletiert oder  
mutiert werden oder gegenüber natürlich vorkommen-  
den Nukleotidsequenzen geringer oder gar nicht  
exprimiert werden.
- 15
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 21 bis 23,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass Mikroorganismen aus der Gruppe Corynebacteri-  
um, Brevibacterium, Arthrobacter, Pseudomonas, No-  
cardia, Methylobacterium, Hyphomicrobium, Alcalige-  
nes oder Klebsiella eingesetzt werden.
- 20
25. Verfahren nach einem der Ansprüche 21 bis 24,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1  
bis 6, eine Genstruktur gemäß Anspruch 7 oder ein  
Vektor gemäß Anspruch 8 eingesetzt wird.

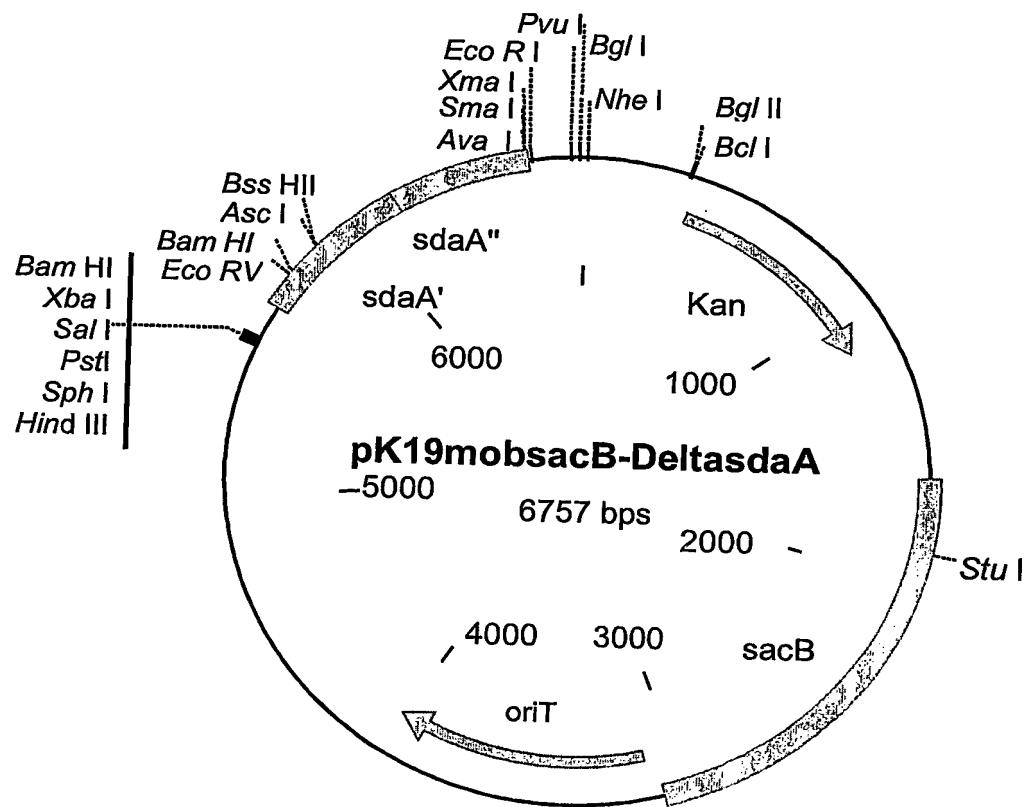


Fig. 1

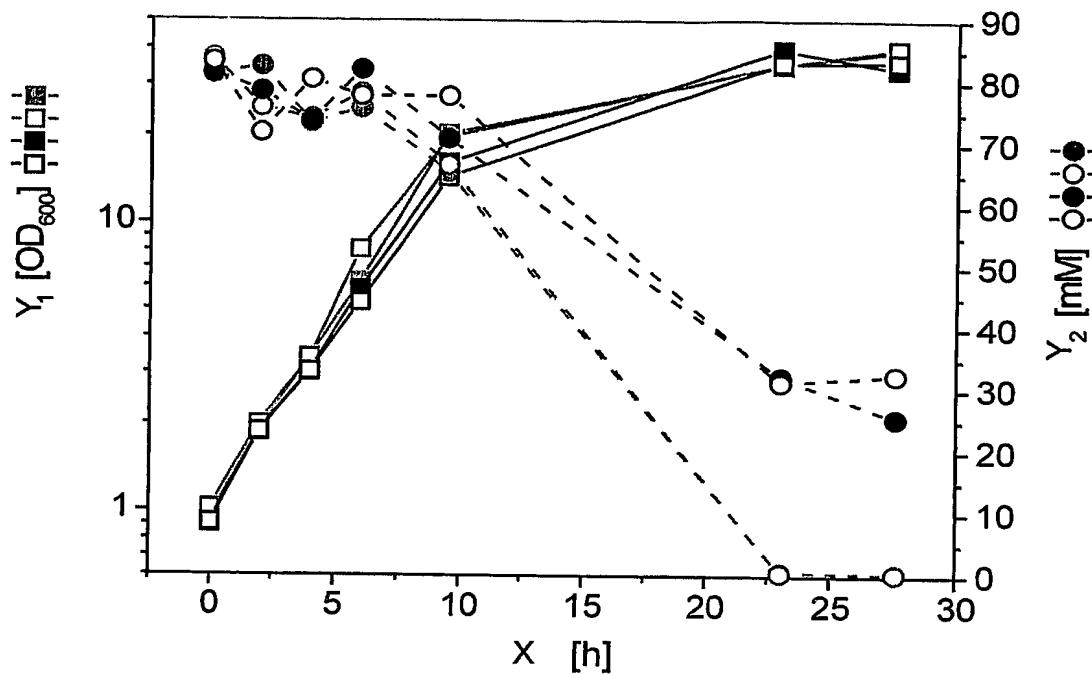


Fig. 2

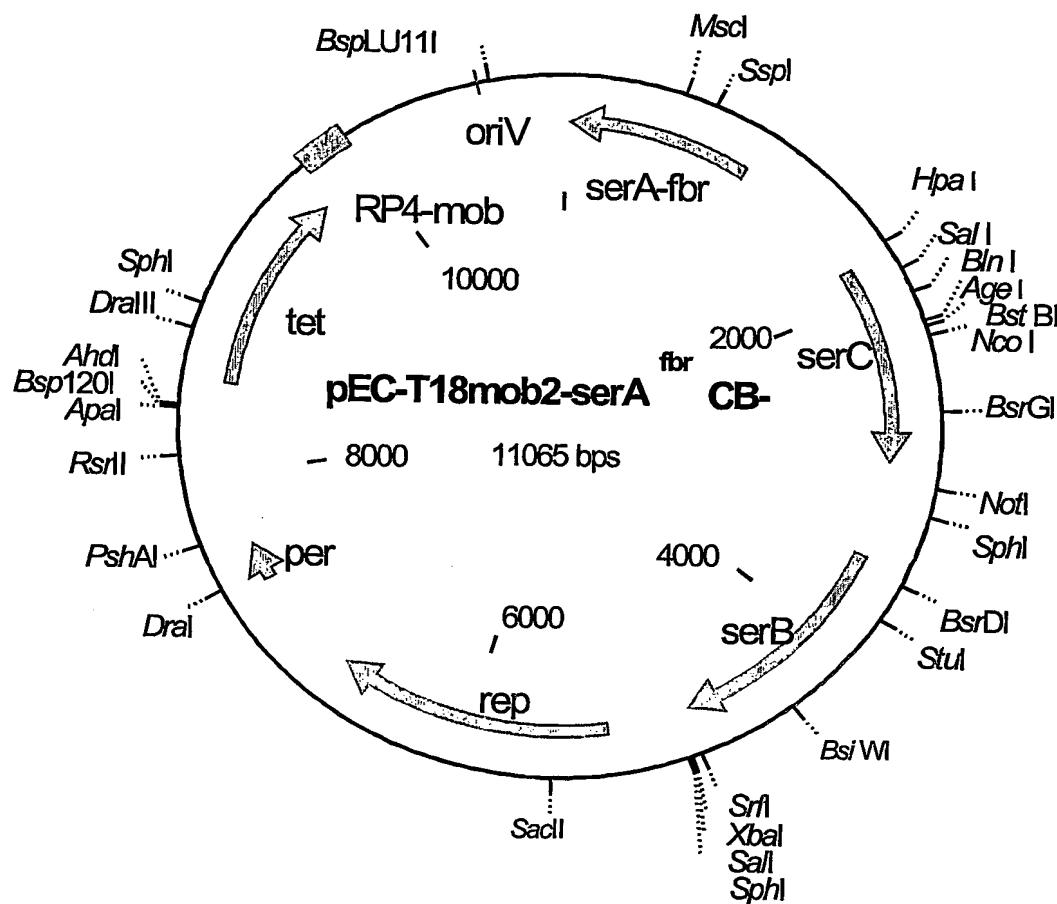


Fig. 3

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Forschungszentrum Jülich GmbH  
<120> Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von L-Serin  
<130> PT 1.2057  
<140>  
<141>  
<160> 2  
<170> PatentIn Ver. 2.1  
<210> 1  
<211> 1449  
<212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum  
<400> 1  
tcgtgcaact tcagactctt acggaggcga tggacccaaa acaactacaa tcaagcagat 60  
cacccttgtac accaccatag aaaaggccca ccctcagcca tggctatcag tggatgtat 120  
ctattttagca tcggtatcgg accatcatcc tcacataccg tcggccccc gagagccgccc 180  
ctcacgtata tctctgaatt tcccgagctcg catgtcgata tcacgttgca cggatccctt 240  
gccggccaccc gtaaaggcca ctgcactgac cggggcggtat tactgggtct ggtggatgg 300  
gaaccaacga tagttccat tgatgctgca ccctcaccgg ggcgcggat tcctgcgaaa 360  
ggttctgtga acggggccaaa gggAACGGTG tcgtattccc tgacgttta tcctcatcct 420  
cttccagaac accccaaatgc ctgttacctt aaaggatcaa ccacaaggac ttatttgcgt 480  
gtgggtggtg ggttcattat gacgttggag gattccggaa agctggacga tatcggatca 540  
ggtgtgtca ccattccatcc agaggcagag gtgccttgc ctttcagaa gagttcccaa 600  
ttactcgcat atggtcgtga ttttgcggag gtcatgaagg ataatgagcg cttaatccac 660  
ggggatcttg gcacagtggaa tgcccatttg gatcgagtgt ggcagattat gcaggagtgc 720  
gtggcacaag gcatcgcaac gcccggatt ttaccgggtg ggttgaatgt gcaacgtcgg 780  
gccccgcagg tacacgcgt gattagcaac ggggatacgt gtgagctggg tgctgatctt 840  
gatgctgtgg agtgggtgaa tctgtacgcc ttggcggtga atgaagaaaa cggccgtgg 900  
ggtcgtgtgg ttactgctcc gactaatggt gtcggggaa ttattccggc ggtgatgcac 960  
tatgcgcggg atttttgac aggtttggg gcgagcagg cgcggacgtt tttgtataacc 1020  
gccccgtggg tgggcatcat cattaaggaa aatgcctcga tctctggcgc ggaggtgggg 1080  
tgtcagggtg aggttgggtc agcgtccgcg atggcggtg cccgggtgtg tgcagtctta 1140  
ggtggttctc cgcaacagggt gggaaacgcgc gcccggatgg cgttggagca caatttggga 1200  
ttgacgtgcg atccgggtggg cgggttagtg cagattccgt gtattgaacg caacgcattt 1260  
gctgccatga agtccatcaa tgcggcaagg cttgcggcga ttgggtatgg caacaatcgc 1320  
gtgagtttgg atgatgtggt ggtcacgtg gtcacccgg gcccggacat gtcgaccaaa 1380  
tataaggaaa cgtcccttgg tgggttggca accaccttgg gcttcccggt gtcgatgacg 1440  
gagtgttag

1449

<210> 2  
<211> 449  
<212> PRT  
<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 2

Met Ala Ile Ser Val Val Asp Leu Phe Ser Ile Gly Ile Gly Pro Ser  
1 5 10 15

Ser Ser His Thr Val Gly Pro Met Arg Ala Ala Leu Thr Tyr Ile Ser  
20 25 30

Glu Phe Pro Ser Ser His Val Asp Ile Thr Leu His Gly Ser Leu Ala  
35 40 45

Ala Thr Gly Lys Gly His Cys Thr Asp Arg Ala Val Leu Leu Gly Leu  
50 55 60

Val Gly Trp Glu Pro Thr Ile Val Pro Ile Asp Ala Ala Pro Ser Pro  
65 70 75 80

Gly Ala Pro Ile Pro Ala Lys Gly Ser Val Asn Gly Pro Lys Gly Thr  
85 90 95

Val Ser Tyr Ser Leu Thr Phe Asp Pro His Pro Leu Pro Glu His Pro  
100 105 110

Asn Ala Val Thr Phe Lys Gly Ser Thr Thr Arg Thr Tyr Leu Ser Val  
115 120 125

Gly Gly Gly Phe Ile Met Thr Leu Glu Asp Phe Arg Lys Leu Asp Asp  
130 135 140

Ile Gly Ser Gly Val Ser Thr Ile His Pro Glu Ala Glu Val Pro Cys  
145 150 155 160

Pro Phe Gln Lys Ser Ser Gln Leu Ala Tyr Gly Arg Asp Phe Ala  
165 170 175

Glu Val Met Lys Asp Asn Glu Arg Leu Ile His Gly Asp Leu Gly Thr  
180 185 190

Val Asp Ala His Leu Asp Arg Val Trp Gln Ile Met Gln Glu Cys Val  
195 200 205

Ala Gln Gly Ile Ala Thr Pro Gly Ile Leu Pro Gly Gly Leu Asn Val  
210 215 220

Gln Arg Arg Ala Pro Gln Val His Ala Leu Ile Ser Asn Gly Asp Thr  
225 230 235 240

Cys Glu Leu Gly Ala Asp Leu Asp Ala Val Glu Trp Val Asn Leu Tyr  
245 250 255

Ala Leu Ala Val Asn Glu Glu Asn Ala Ala Gly Gly Arg Val Val Thr  
260 265 270

Ala Pro Thr Asn Gly Ala Ala Gly Ile Ile Pro Ala Val Met His Tyr  
275 280 285

Ala Arg Asp Phe Leu Thr Gly Phe Gly Ala Glu Gln Ala Arg Thr Phe  
290 295 300

Ieu Tyr Thr Ala Gly Ala Val Gly Ile Ile Lys Glu Asn Ala Ser  
305 310 315 320

Ile Ser Gly Ala Glu Val Gly Cys Gln Gly Glu Val Gly Ser Ala Ser  
325 330 335

Ala Met Ala Ala Ala Gly Leu Cys Ala Val Leu Gly Gly Ser Pro Gln  
340 345 350

Gln Val Glu Asn Ala Ala Glu Ile Ala Leu Glu His Asn Leu Gly Leu  
355 360 365

Thr Cys Asp Pro Val Gly Gly Leu Val Gln Ile Pro Cys Ile Glu Arg  
370 375 380

Asn Ala Ile Ala Ala Met Lys Ser Ile Asn Ala Ala Arg Leu Ala Arg  
385 390 395 400

Ile Gly Asp Gly Asn Asn Arg Val Ser Leu Asp Asp Val Val Val Thr  
405 410 415

Met Ala Ala Thr Gly Arg Asp Met Leu Thr Lys Tyr Lys Glu Thr Ser  
420 425 430

Leu Gly Gly Leu Ala Thr Thr Leu Gly Phe Pro Val Ser Met Thr Glu  
435 440 445

Cys

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
23. September 2004 (23.09.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2004/081166 A3**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/60, 9/88, C12P 13/06, C12N 1/21

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2004/000248

(22) Internationales Anmeldedatum: 12. Februar 2004 (12.02.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität: 103 11 399.1 13. März 2003 (13.03.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH [DE/DE]; Wilhelm-Johnen-Strasse, 52425 Jülich (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PETERS-WENDISCH, Petra [DE/DE]; Martinusstrasse 2a, 52428 Jülich (DE). NETZER, Roman [DE/DE]; Adolf-Fischer-Strasse 47, 52428 Jülich (DE). EGGLING, Lothar [DE/DE]; Elsenkamp 6, 52428 Jülich (DE). SAHM, Hermann [DE/DE]; Wendelinusstrasse 71, 52428 Jülich (DE).

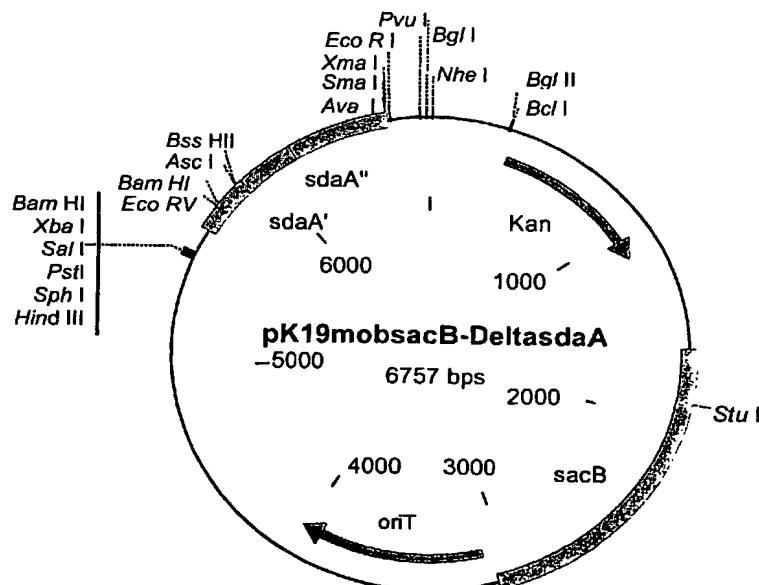
(74) Gemeinsamer Vertreter: FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH; Fachbereich Patente, 52425 Jülich (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: NUCLEOTIDE SEQUENCES OF CORYNEFORM BACTERIA CODING FOR PROTEINS INVOLVED IN L-SERINE METABOLISM AND METHOD FOR PRODUCING L-SERINE

(54) Bezeichnung: NUKLEOTIDSEQUENZEN CORYNEFORMER BAKTERIEN CODIEREND FÜR AM L-SERINSTOFF-WECHSEL BETEILIGTE PROTEINE SOWIE VERFAHREN ZUR MIKROBIELLEN HERSTELLUNG VON L-SERIN



(57) Abstract: The invention relates to the nucleotide sequences of coryneform bacteria coding for proteins which are involved in L-serine metabolism with reduced and switched off L-serine dehydratase. Said invention also relates to micro-organisms and to methods for producing L-serine.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2004/081166 A3



MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht

**(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts:**

17. März 2005

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

**(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart):** ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT,

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/DE2004/000248

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C12N15/60 C12N9/88 C12P13/06 C12N1/21			
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC			
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C12P			
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched			
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search			
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>			
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
X	WO 01/00843 A (BASF AG) 4 January 2001 (2001-01-04) see SEQ ID NO: 139-142 (pp.366-372) page 3 - page 54; claims 1-34; examples 4,8 page 57 ----	1-25	
X	KUBOTA K: "IMPROVED PRODUCTION OF L SERINE BY MUTANTS OF CORYNEBACTERIUM-GLYCINOPHILUM WITH LESS SERINE DEHYDRATASE EC-4.2.1.13 ACTIVITY" AGRICULTURAL AND BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 49, no. 1, 1985, pages 7-12, XP002287205 ISSN: 0002-1369 cited in the application the whole document ---- -/-/	9-13	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.	
° Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed			
Date of the actual completion of the international search <b>6 July 2004</b>		Date of mailing of the international search report <b>18.08.2004</b>	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer <b>Oderwald, H</b>	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/DE2004/000248

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category ° Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Relevant to claim No.

X US 4 528 273 A (LOVINGER GERALD G ET AL)  
9 July 1985 (1985-07-09)  
cited in the application  
column 1, paragraph 1 - column 4,  
paragraph 5; claims 1,10,14; example 1  
-----

14-19,  
21-25

A US 3 623 952 A (KUBOTA KOJI ET AL)  
30 November 1971 (1971-11-30)  
cited in the application  
the whole document  
-----

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE2004/000248

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 0100843	A 04-01-2001	AU 5421300	A 31-01-2001	AU 5421300 A 31-01-2001
		BR 0011806	A 14-05-2002	BR 0011806 A 14-05-2002
		CA 2383865	A1 04-01-2001	CA 2383865 A1 04-01-2001
		CN 1371417	T 25-09-2002	CN 1371417 T 25-09-2002
		EP 1257649	A2 20-11-2002	EP 1257649 A2 20-11-2002
		ES 2177475	T1 16-12-2002	ES 2177475 T1 16-12-2002
		WO 0100843	A2 04-01-2001	WO 0100843 A2 04-01-2001
		PL 353541	A1 01-12-2003	PL 353541 A1 01-12-2003
		SK 18862001	A3 06-11-2002	SK 18862001 A3 06-11-2002
		TR 200103707	T2 23-09-2002	TR 200103707 T2 23-09-2002
		US 2003162267	A1 28-08-2003	US 2003162267 A1 28-08-2003
		AU 5559000	A 31-01-2001	AU 5559000 A 31-01-2001
		BR 0011805	A 14-05-2002	BR 0011805 A 14-05-2002
		CA 2383875	A1 04-01-2001	CA 2383875 A1 04-01-2001
		CN 1370235	T 18-09-2002	CN 1370235 T 18-09-2002
		CZ 20014659	A3 11-09-2002	CZ 20014659 A3 11-09-2002
		EP 1263963	A2 11-12-2002	EP 1263963 A2 11-12-2002
		ES 2178979	T1 16-01-2003	ES 2178979 T1 16-01-2003
		WO 0100844	A2 04-01-2001	WO 0100844 A2 04-01-2001
		JP 2003517291	T 27-05-2003	JP 2003517291 T 27-05-2003
		PL 353388	A1 17-11-2003	PL 353388 A1 17-11-2003
		SK 18872001	A3 03-12-2002	SK 18872001 A3 03-12-2002
		TR 200103706	T2 21-10-2002	TR 200103706 T2 21-10-2002
		US 2003049804	A1 13-03-2003	US 2003049804 A1 13-03-2003
		AU 5836900	A 31-01-2001	AU 5836900 A 31-01-2001
		BR 0011811	A 18-06-2002	BR 0011811 A 18-06-2002
		CA 2380870	A1 04-01-2001	CA 2380870 A1 04-01-2001
		CN 1451047	T 22-10-2003	CN 1451047 T 22-10-2003
		EP 1290178	A2 12-03-2003	EP 1290178 A2 12-03-2003
		ES 2184658	T1 16-04-2003	ES 2184658 T1 16-04-2003
		HU 0203340	A2 28-01-2003	HU 0203340 A2 28-01-2003
		WO 0100804	A2 04-01-2001	WO 0100804 A2 04-01-2001
		JP 2003525593	T 02-09-2003	JP 2003525593 T 02-09-2003
		SK 18882001	A3 10-09-2002	SK 18882001 A3 10-09-2002
		TR 200103709	T2 21-08-2002	TR 200103709 T2 21-08-2002
		AU 5421600	A 31-01-2001	AU 5421600 A 31-01-2001
		BR 0011810	A 07-05-2002	BR 0011810 A 07-05-2002
		CA 2380863	A1 04-01-2001	CA 2380863 A1 04-01-2001
		CN 1370236	T 18-09-2002	CN 1370236 T 18-09-2002
		CZ 20014660	A3 11-09-2002	CZ 20014660 A3 11-09-2002
		EP 1255839	A2 13-11-2002	EP 1255839 A2 13-11-2002
		ES 2177476	T1 16-12-2002	ES 2177476 T1 16-12-2002
		WO 0100805	A2 04-01-2001	WO 0100805 A2 04-01-2001
		JP 2004513603	T 13-05-2004	JP 2004513603 T 13-05-2004
		SK 18912001	A3 08-10-2002	SK 18912001 A3 08-10-2002
		TR 200103708	T2 21-08-2002	TR 200103708 T2 21-08-2002
		US 6696561	B1 24-02-2004	US 6696561 B1 24-02-2004
		US 2004030116	A1 12-02-2004	US 2004030116 A1 12-02-2004
		AU 5420500	A 31-01-2001	AU 5420500 A 31-01-2001
		BR 0011803	A 09-04-2002	BR 0011803 A 09-04-2002
US 4528273	A 09-07-1985	AU 3560984	A 30-05-1985	AU 3560984 A 30-05-1985
		DE 3441549	A1 05-06-1985	DE 3441549 A1 05-06-1985
		FR 2555198	A1 24-05-1985	FR 2555198 A1 24-05-1985
		GB 2150135	A 26-06-1985	GB 2150135 A 26-06-1985
		IT 1177116	B 26-08-1987	IT 1177116 B 26-08-1987
		JP 60120996	A 28-06-1985	JP 60120996 A 28-06-1985
		NL 8403540	A 17-06-1985	NL 8403540 A 17-06-1985

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE2004/000248

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4528273	A	SE 8405868 A	23-05-1985
US 3623952	A	30-11-1971 NONE	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/DE2004/000248

A. KLASSEFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 C12N15/60 C12N9/88 C12P13/06 C12N1/21

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 C12N C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie <sup>a</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 01/00843 A (BASF AG) 4. Januar 2001 (2001-01-04) see SEQ ID NO: 139-142 (pp.366-372) Seite 3 - Seite 54; Ansprüche 1-34; Beispiele 4,8 Seite 57 -----	1-25
X	KUBOTA K: "IMPROVED PRODUCTION OF L SERINE BY MUTANTS OF CORYNEBACTERIUM-GLYCINOPHILUM WITH LESS SERINE DEHYDRATASE EC-4.2.1.13 ACTIVITY" AGRICULTURAL AND BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 49, Nr. 1, 1985, Seiten 7-12, XP002287205 ISSN: 0002-1369 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	9-13
	-/-	

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- <sup>b</sup> Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche  6. Juli 2004	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts  18. 08. 2004
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter  Oderwald, H

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2004/000248

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 4 528 273 A (LOVINGER GERALD G ET AL) 9. Juli 1985 (1985-07-09) in der Anmeldung erwähnt Spalte 1, Absatz 1 - Spalte 4, Absatz 5; Ansprüche 1,10,14; Beispiel 1 -----	14-19, 21-25
A	US 3 623 952 A (KUBOTA KOJI ET AL) 30. November 1971 (1971-11-30) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2004/000248

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung	
WO 0100843	A	04-01-2001	AU 5421300 A BR 0011806 A CA 2383865 A1 CN 1371417 T EP 1257649 A2 ES 2177475 T1 WO 0100843 A2 PL 353541 A1 SK 18862001 A3 TR 200103707 T2 US 2003162267 A1 AU 5559000 A BR 0011805 A CA 2383875 A1 CN 1370235 T CZ 20014659 A3 EP 1263963 A2 ES 2178979 T1 WO 0100844 A2 JP 2003517291 T PL 353388 A1 SK 18872001 A3 TR 200103706 T2 US 2003049804 A1 AU 5836900 A BR 0011811 A CA 2380870 A1 CN 1451047 T EP 1290178 A2 ES 2184658 T1 HU 0203340 A2 WO 0100804 A2 JP 2003525593 T SK 18882001 A3 TR 200103709 T2 AU 5421600 A BR 0011810 A CA 2380863 A1 CN 1370236 T CZ 20014660 A3 EP 1255839 A2 ES 2177476 T1 WO 0100805 A2 JP 2004513603 T SK 18912001 A3 TR 200103708 T2 US 6696561 B1 US 2004030116 A1 AU 5420500 A BR 0011803 A	31-01-2001 14-05-2002 04-01-2001 25-09-2002 20-11-2002 16-12-2002 04-01-2001 01-12-2003 06-11-2002 23-09-2002 28-08-2003 31-01-2001 14-05-2002 04-01-2001 18-09-2002 11-09-2002 11-12-2002 16-01-2003 04-01-2001 27-05-2003 17-11-2003 03-12-2002 21-10-2002 13-03-2003 31-01-2001 18-06-2002 04-01-2001 22-10-2003 12-03-2003 16-04-2003 28-01-2003 04-01-2001 02-09-2003 10-09-2002 21-08-2002 31-01-2001 07-05-2002 04-01-2001 18-09-2002 11-09-2002 13-11-2002 16-12-2002 04-01-2001 13-05-2004 08-10-2002 21-08-2002 24-02-2004 12-02-2004 31-01-2001 09-04-2002	----- 30-05-1985 05-06-1985 24-05-1985 26-06-1985 26-08-1987 28-06-1985 17-06-1985
US 4528273	A	09-07-1985	AU 3560984 A DE 3441549 A1 FR 2555198 A1 GB 2150135 A IT 1177116 B JP 60120996 A NL 8403540 A	----- 30-05-1985 05-06-1985 24-05-1985 26-06-1985 26-08-1987 28-06-1985 17-06-1985	

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2004/000248

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 4528273	A	SE 8405868 A	23-05-1985
US 3623952	A	30-11-1971 KEINE	